



Title	Novel Pharmacological Target for the Treatment of Ocular Neovascular Diseases [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	木下, 哲志
Description	配架番号 : 2145
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11663号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59074
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Satoshi_Kinoshita_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 木下 哲志

学 位 論 文 題 名

Novel Pharmacological Target for the Treatment of Ocular Neovascular Diseases
(眼内血管新生性疾患に対する新規治療の探索)

【背景と目的】

加齢黄斑変性(age-related macular degeneration, AMD)は難治性の眼内血管新生性疾患であり、我が国における中途失明原因の一つである。特に超高齢社会を迎えた現在では患者数も増加しており、その治療法の確立が急務である。AMD は滲出型と萎縮型に分類されるが、滲出型 AMD は我が国でその発症率が多く、また急激に進行し予後も不良な病型であるため臨床的にも重要視されている。この滲出型 AMD は黄斑部の網膜下あるいは網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 下にドルーゼンと呼ばれる免疫反応や炎症反応に関与する物質が沈着し、慢性炎症を引き起こすことで脈絡膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) が生じる疾患である。CNV の未成熟な血管構造は出血や血漿漏出の原因となるために、網膜機能の低下および重篤な視力低下につながる。

従来、AMD の治療には光感受性物質を静脈内投与したのちに眼底にレーザーを照射することで CNV を閉塞させる光線力学的療法 (photodynamic therapy, PDT) が考案され実施されてきたが、近年は AMD の病態に深く関わる血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) を阻害する抗 VEGF 抗体の眼内投与が主流となっている。しかし、視力の維持には長期間に渡る反復投与を要する場合が多く、眼内注射による感染リスクや脳梗塞などの血管イベントのリスクが問題となっており、安全性の面から抗 VEGF 療法の代替あるいは補助的な治療が模索されている。

近年、滲出型 AMD の予防や補助療法を目的としたフードファクターの基礎研究やランダム化比較試験がおこなわれており、既に一部のサプリメントが応用され市販化されている。ゲニステインは大豆などマメ科植物に含まれるイソフラボンの中でも代表的な物質であり、これまで関節リウマチの動物モデルにおける抗炎症効果のほか、膀胱癌や肝臓癌における動物モデルにおける血管新生抑制効果を持つことが報告されている。眼科領域では動物モデルにおける CNV の抑制効果が報告されているが、そのメカニズムに関しては検討されておらず未だに解明されていない。今回の研究の目的は、ゲニステインが CNV 形成を抑制するメカニズムについて検討することである。

【材料と方法】

生後 8 週齢、雄の C57BL/6J マウスに 0.5%ゲニステイン混合餌を投与し、マウス眼底にレーザーを 4 発照射して CNV を誘導した。レーザー照射 7 日後に麻酔下で脱血したのち左心室から 0.5%フルオレセイン標識デキストランを灌流し、摘出した眼球から脈絡膜フラットマウントを作製して、CNV 面積を計測し比較することで CNV の抑制効果を検討した。さらにゲニステインによる CNV 抑制機序を検討するために、レーザー照射 3 日後の RPE-脈絡膜複合体中に含まれる単球走化因子[monocyte chemoattractant protein (MCP)-1]、白血球接着因子[intercellular adhesion molecule (ICAM)-1]、マトリックスメタロプロテアーゼ[matrix metalloproteinase (MMP)]-9 を ELISA 法で測定した。また、レーザー照射 3

日後に採取した脈絡膜に対して抗CD31抗体と抗F4/80抗体を用いて蛍光二重染色をおこない、CNVに浸潤するマクロファージを観察してCNV面積1000mm²あたりのマクロファージ数を算出し比較した。レーザー照射1日後あるいは3日後のRPE-脈絡膜複合体からRNAを回収し、real-time PCR法を用いて*F4/80*と*Ets-1*の発現を比較検討した。

【結果】

CNVの平均面積はコントロール群で21074.0±1940.7 μm²、ゲニステイン投与群で15441.9±1511.8 μm²であり、ゲニステイン群で減少していた (P<0.05)。RPE-脈絡膜複合体におけるMCP-1はCNV非誘導コントロール群では検出できず、CNV誘導コントロール群では30.9±3.5 pg/mgに増加しており (P<0.01)、CNV誘導ゲニステイン投与群では20.0±2.7 pg/mgと減少していた (P<0.05)。ICAM-1はCNV非誘導コントロール群では124.1±3.2 ng/mgで、CNV誘導コントロール群では138.2±4.0 ng/mgと増加していたが (P<0.05)、CNV誘導ゲニステイン投与群では124.2±2.7 ng/mgと減少していた。MMP-9はCNV非誘導コントロール群では84.4±6.1 pg/mg、CNV誘導コントロール群では148.3±13.6 pg/mgに増加していたが (P<0.05)、CNV誘導ゲニステイン投与群では109.0±9.0 pg/mgと減少していた (P<0.05)。免疫組織学的検討では、CNVに浸潤するF4/80陽性マクロファージの数は、コントロール群ではCNV面積1000mm²あたり24.4±2.7個であるのに対してゲニステイン投与群では8.8±0.8個と有意に減少 (P<0.01) していた。またRPE-脈絡膜複合体における*F4/80* mRNAの発現はゲニステイン投与群ではコントロール群と比較して56%抑制されていた (P<0.05)。さらに*Ets-1* mRNAの発現は、CNV誘導コントロール群ではCNV非誘導コントロール群に対して66%増加 (P<0.01) しており、CNV誘導ゲニステイン投与群ではCNV誘導コントロール群に対して35%減少 (P<0.05) していた。

【考察】

既報によると、CNVの形成にはマクロファージが関与しており、MCP-1とICAM-1はマクロファージの浸潤に関与するとされる。さらに転写因子Ets-1はMCP-1とICAM-1の発現を誘導するとされている。今回の結果から、ゲニステインは転写因子Ets-1の発現を抑制し、MCP-1とICAM-1の発現を抑制することでマクロファージ浸潤を抑制し、CNVの形成を抑制したと思われる。一方で、血管新生の段階において血管基底膜を分解するMMP-9もCNVの形成に関与するとされ、さらにEts-1はMMP-9の発現を誘導するという報告がある。以上より、ゲニステインはEts-1の発現を抑制し、MMP-9を抑制することでもCNV形成を抑制したと考えられる。

【結論】

ゲニステインは転写因子やその下流の関連分子を抑制することで、CNVの形成を抑制することが示された。本研究の結果から、ゲニステインの摂取によって滲出型AMDにおけるCNV形成を抑制できる可能性が示唆された。